

「アレルギー疾患・自己免疫疾患などの発症機構と治療技術」
平成 21 年度採択研究代表者

烏山 一

東京医科歯科大学大学院・医歯学総合研究科・教授

新たなアレルギー発症機構の解明とその制御

§ 1. 研究実施の概要

本研究では、これまで知られていなかった好塩基球ならびにサイトカイン・シグナル伝達異常に起因する新たなアレルギー発症と制御の分子機構を解明し、新規アレルギー治療法開発の基盤技術確立をめざす。これまで好塩基球研究が立ち後れていた最大の原因は、好塩基球特異的な解析ツールがほとんど無かったことにある。とくに病態モデル動物として有用なマウスでは、ギムザ染色法など従来の解析法で好塩基球を同定することはきわめて困難で、そのためマウスには好塩基球が存在しないとすらいわれていた。そこで本年度、烏山サブグループはまず、好塩基球の同定ならびに好塩基球の生体内イメージングに最適なモデルマウスとして、「好塩基球特異的に緑色蛍光蛋白質を発現する遺伝子改変マウス」を開発した。さらに、好塩基球機能解析のために多くの研究者が長い間待ち望んでいた「好塩基球のみを欠損する遺伝子改変モデルマウス」をついに樹立した。これらの画期的ツールの開発により、生体内での好塩基球の動態解析・機能解析ならびに好塩基球を標的とした新規アレルギー治療法の研究が今後大きく発展していくと期待される。峯岸サブグループは、高 IgE 症候群におけるアレルギー病態に注目し、患者の免疫細胞を解析したところ、抑制性サイトカインのシグナル伝達異常があり、そのために制御性樹状細胞の分化誘導が障害されていることをつきとめた。さらに、患者と全く同じ遺伝子変異を有する高 IgE 症候群モデルマウスを作製した。この遺伝子改変マウスにおける免疫異常ならびに骨形成障害の分子機序を解析することによって、本症候群の本態が明らかにされるとともに、慢性アレルギー疾患治療のための新たな分子標的の探索が可能となると思われる。

§ 2. 研究実施体制

(1)「烏山」グループ

① 研究分担グループ長: 烏山 一 (東京医科歯科大学、教授)

② 研究項目

「烏山」サブグループ

1. 好塩基球によるアレルギー炎症終焉機構の解明
2. 好塩基球によるアレルギー炎症誘導の分子機構の解明
3. 好塩基球特異的 GFP 発現マウスを用いた好塩基球の生体内ライブ・イメージング解析
4. 好塩基球欠損ノックインマウス等を用いた好塩基球の生体内機能解析
5. 好塩基球ならびにその産生物を標的としたアレルギー制御法の検証と基盤技術の確立

「峯岸」サブグループ

1. 変異 STAT3 ノックインマウスを用いた新規アレルギー発症機構の解明と治療標的の同定
2. 変異STAT3ノックインマウスを用いたTh17関連自己免疫疾患・骨疾患の制御機構の解析
3. 非 STAT3 型高 IgE 症候群の新規責任遺伝子の同定と単一遺伝子異常によるアレルギー発症機構の解明

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

1. 好塩基球の機能解析ならびに好塩基球を標的とした新規アレルギー治療法の研究に必要な解析ツールの開発(烏山サブグループ)

好塩基球は、末梢白血球のわずか 0.5%を占めるに過ぎない最少血球細胞であり、また末梢組織に常在するマスト細胞といくつもの類似点があるために、「血液循環型マスト細胞」としてマスト細胞のバックアップ的存在であると長い間考えられてきた。ところが私たちの研究を含む最新の研究により、好塩基球がマスト細胞とは異なった機序で、アレルギー反応の誘導や獲得免疫反応の制御に重要な働きをしていることが次第に明らかになってきた。しかしながら、いまだに好塩基球の解析に必須なツールがきわめて限られており、好塩基球研究をさらに進展させる上で大きな障害になっている。そこで研究の初年度にあたる本年度では、好塩基球研究に必要な新たな解析ツールの開発をおこなった。

疾患モデル遺伝子改変動物の樹立に代表されるように、マウスを用いた病態解析は非常に有用であるが、好塩基球を対象にした研究において、マウスは不向きとされ、モルモットを用いた実験が主であった。従来の方法(組織のギムザ染色など)でマウスの好塩基球を同定することは非常に困難であり、そのため長い間マウスには好塩基球が存在しないと誤解されていた。電子顕微鏡を用いた形態的解析からマウスにも好塩基球が存在することが証明されたが、電子顕微鏡的好塩基球の解析は現実的ではない。そこで本研究では、生体内での好塩基球の同定ならびに動態解析を

可能とすべく、検出に適したマーキングを好塩基球にほどこしたモデルマウスの樹立を試みた。すなわち、好塩基球に特異的に発現する遺伝子を検索・同定し(Ugajin et al. *J. Leukoc. Biol.*, 2009)、そのプロモーターの下流に緑色蛍光蛋白質 (green fluorescence protein, GFP) をコードする遺伝子を置換・挿入した遺伝子改変マウスを作製した。各細胞種における GFP の発現を解析したところ、期待通り好塩基球においてのみ GFP の強い発現が認められ、フローサイトメーターや共焦点顕微鏡による好塩基球の特異的検出に最適であることが判明した。現在、免疫・アレルギー反応の解析に用いるために純系マウスに戻し交配し、生体内イメージング技術を応用した好塩基球の動態解明を進めている。

好塩基球研究を進める上でもうひとつの大きな障害となっているのが、好塩基球のみを欠損するモデル動物が存在しないことである。マスト細胞の機能解析が、*c-Kit* 遺伝子の自然変異によるマスト細胞欠損マウスの同定・解析により飛躍的に進んだのとは対照的である。そこで本研究では、上記の好塩基球特異的 GFP 発現マウスにおいて有用性が確認された好塩基球特異的発現遺伝子座に細菌毒素受容体遺伝子をノックインした遺伝子改変マウスを作製した。このマウスでは好塩基球は正常に生成されるが、細菌毒素を投与すると好塩基球のみが生体から消失することが確認された。現在、純系マウスに戻し交配し、好塩基球の生体内機能解明を進めている。

これらの画期的ツールの開発により、好塩基球の動態・機能解析ならびに好塩基球を標的とした新規アレルギー治療法に関する研究が今後大きく発展していくと期待される。

2. 高 IgE 症候群におけるアレルギー病態の解明(峯岸サブグループ)

高 IgE 症候群は、細菌・真菌による感染症を繰り返しおこすという免疫不全症状と、血中 IgE 高値ならびにアトピー性皮膚炎といったアレルギー症状が同居するという複雑な免疫異常症である。40 年以上の長きにわたりその原因は不明のままであったが、私たちは種々のサイトカインのシグナル伝達に寄与する分子 STAT3 をコードする遺伝子の突然変異が本疾患の原因であることを明らかにした。免疫不全症状は、STAT3 変異に起因する Th17 細胞の分化・機能障害にて説明することができる(Minegishi et al. *J. Exp. Med.* 2009)が、アレルギー症状に関しては Th17 細胞異常では説明しきれない。そこで、抑制性サイトカインのシグナル伝達障害に起因する制御性細胞の誘導不全の可能性を検討した。その結果、高 IgE 症候群患者では抑制性サイトカインによる制御性樹状細胞の分化が障害されていることが明らかとなった。現在、さらに制御性 T 細胞の分化誘導の障害についても解析を進めている。

高 IgE 症候群における免疫異常ならびに骨形成異常の病態を患者検体のみで解析するにはおのずと限界がある。そこで、組み換え遺伝子操作により、患者と全く同じ STAT3 遺伝子変異を有する高 IgE 症候群モデルマウスを作製した。現在、このマウスにおける免疫異常ならびに骨形成異常の解析を進めている。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

・論文詳細情報

Nakata, K., Kobayashi, K., Ishikawa, Y., Yamamoto, M., Funada, Y., Kotani, Y., Blumberg, R.S., Karasuyama, H., Yoshida, M., and Nishimura, Y.: The transfer of maternal antigen-specific IgG regulates the development of allergic airway inflammation early in life in an FcRn-dependent manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* in press.